

DWPI

DERWENT-ACC-NO: 1990-168450

DERWENT-WEEK: 199022

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Working electrode for immuno-sensor - comprises electroconductive high polymer formed on porous electrode and antibody or antigen immobilised in polymer

PATENT-ASSIGNEE: TEIJIN LTD[TEIJ]

PRIORITY-DATA: 1988JP-0262971 (October 20, 1988)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO MAIN-IPC	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES
JP 02110363 A	April 23, 1990	N/A	000 N/A
APPLICATION-DATA: PUB-NO JP02110363A 1988	APPL-DESCRIPTOR N/A	APPL-NO 1988JP-0262971	APPL-DATE October 20,

INT-CL_(IPC): G01N027/32; G01N033/54

ABSTRACTED-PUB-NO: JP02110363A

BASIC-ABSTRACT: A working electrode for immunosensor comprises an electroconductivea high polymer formed on a porous electrode and antibody or antigen immobilised in the electroconductive high polymer or/ and on the surface of the high polymer.

USE/ADVANTAGE - The working electrode is used for immunosensor for detecting antigen or antibody. As the immunosensor consisting of the working electrode has very large surface area per unit volume, high sensitivity is obtd. Antigen or antibody of a dilute concn. in a sample liq. is detected by the sensor. Even when the sensor is stood in aq. soln. for a long time, the antibody or antigen immobilised in or/and on the electroconductive high polymer is not liberated, resulting in no deterioration of the detection characteristics of the sensor.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: A89 B04 J04 S03 S05

CPI-CODES: A09-A03; A12-E13; A12-E14; A12-V03C2; B04-B04C; B11-C07A; B12-K04; J04-B01;

EPI-CODES: S03-E03C; S03-E14H4; S05-C09;

\~15~

CLIPPEDIMAGE= JP402110363A

PAT-NO: JP402110363A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02110363 A

TITLE: WORKING ELECTRODE FOR IMMUNITY SENSOR AND MANUFACTURE THEREOF

PUBN-DATE: April 23, 1990

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

KAWAGUCHI, TAKEYUKI

JO, HISASHI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

TEIJIN LTD

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP63262971

APPL-DATE: October 20, 1988

INT-CL (IPC): G01N027/327; G01N033/543

US-CL-CURRENT: 204/403, 204/415, 436/514

ABSTRACT:

PURPOSE: To achieve high sensitivity by providing a conductive porous body as an electrode for a porous electrode to be used, and forming a device with antibody or antigen which is formed on the electrode and fixed to conductive macromolecules.

CONSTITUTION: A porous electrode to be used is a conductive porous body as an electrode. The body is especially selected out of the following materials: a material wherein a metal thin film is provided on the surface and/or the inner hole wall of organic or inorganic porous body; net-shaped or sponge-shaped metal; and net-shaped carbon fiber. The body comprises conductive macromolecules formed on the electrode and antibody or antigen which is fixed in and/or on the surface of the conductive macromolecules. Any antibody or antigen can be used for the antibody or antigen which is fixed in the conductive macromolecule. In this way, the structure of a highly sensitive sensor characterized by excellent reproducibility and stability for a long time is obtained.

COPYRIGHT: (C)1990, JPO&Japio

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-110363

⑬ Int. Cl.⁵
G 01 N 27/327
33/543

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)4月23日

Z 7906-2G

7363-2G

G 01 N 27/30

357

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全4頁)

⑮ 発明の名称 免疫センサ用動作電極およびその製造方法

⑯ 特 願 昭63-262971

⑰ 出 願 昭63(1988)10月20日

⑲ 発明者 川口 武行 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター基礎研究室内

⑲ 発明者 城 尚志 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター基礎研究室内

⑳ 出願人 帝人株式会社 大阪府大阪市東区南本町1丁目11番地

㉑ 代理人 弁理士 前田 純博

明 示圖 暗書

1. 発明の名称

免疫センサ用動作電極およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 多孔質な電極上に形成された導電性高分子および該導電性高分子の中または／および表面に固定された抗体または抗原からなる免疫センサ用動作電極。

(2) 上記多孔質な電極が、有機または無機多孔質体の表面または／および内孔壁に金属薄膜を設けたもの、網状またはスponジ状金属、および網状炭素繊維から選ばれたものである請求項1記載の免疫センサ用動作電極。

(3) 多孔質な電極上で、導電性高分子を形成しうる電解重合可能な単量体を支持電解質および抗体または抗原の存在下に水溶液中に電解重合し、形成された導電性高分子中に抗体または抗原を包括固定することを特徴とする免疫センサ用動作電極の製造方法。

3. 本発明の詳細な説明

(1) 産業上の利用分野：

本発明は新規な免疫センサ用動作電極に関する。さらに詳しくは、多孔質な電極上に形成された導電性高分子および該高分子中または／および表面に固定された抗体または抗原からなる免疫センサ用動作電極とその製造方法に関する。

(2) 従来技術：

臨床医学の分野において、極めて特異的な生化学反応である抗体－抗原反応を用いた免疫学的診断がこれまで行われてきた。具体的な方法としては、沈降・凝集法、ラジオイムノアッセイ法、エンザイミームノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法等が知られており、実用にも供されている。しかしながら、これらの方法では、特殊な設備や高価な装置を必要としたり、取り扱いが煩雑である等の難点があった。

近年、簡便に抗体または抗原を検出する方法として免疫センサが提案されている。例えば、鈴木、相沢らは抗体または抗原を酢酸セルロース膜に固

定し膜電位を測定することにより抗原または抗体の検出が可能であることを示し (J. Membrane Sci., 2, 125 (1977))、山本、坪村らは抗体または抗原を固定した化学修飾電極を用い、電極電位を測定することにより抗原または抗体を検出した (J. Immunol. Methods, 22, 309 (1978))。また、民谷、輕部らは電界効果型トランジスターのゲート部に抗体を固定し抗原の検出を行ない (第5回化学センサ研究発表会要旨集Z-4 (1986))、谷口らは抗体を固定したポリビロールやポリチオフェンやポリフラン膜を用いると抗原の検出が可能であることを示した (特開昭61-195346号, 63-50747号)。しかしながら、これらの方法では検出感度が低いことや、再現性が悪い、長期間の使用に耐えない等の問題点があった。

(3) 発明の概要

本発明はかかる状況に鑑みてなされたものである。すなわち、再現性に優れた長時間にわたって安定な高感度のセンサの構築を鋭意検討した結果、本発明に到達したものである。

に金属薄膜を設けたもの、網状またはスponジ状金属、および網状炭素繊維から選ばれたものである。これらの多孔質電極の電導度は $0.1S/cm \sim 10^6 S/cm$ であり、また平均孔径は $0.1 \mu m \sim 1 mm$ で、空隙率は $20\sim 80\%$ であることが望ましい。さらに望ましくは、電導度 $1S/cm \sim 10^6 S/cm$ 、平均孔径 $1 \mu m \sim 100 \mu m$ である。電導度が $0.1S/cm$ 以下では多孔質電極に電解重合可能な単量体の電解重合を行うことができず、平均孔径が $0.1 \mu m$ 以下では多孔質電極の内孔壁に電解重合によるポリマーを形成することができない。

本発明で用いられる有機または無機多孔質体は特に制限されず、その表面および内孔壁に電極となる金属薄膜を形成できるものであれば、いかなるものでも使用可能である。その具体例としては、多孔質高分子フィルム、無機フィルター、多孔質繊維、不織布、網状物等が挙げられる。多孔質高分子フィルム、繊維、不織布、および網状物の素材としてはポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、

(4) 本発明の構成：

すなわち、本発明は、

1. 多孔質な電極上に形成された導電性高分子および該導電性高分子の中または／および表面に固定された抗体または抗原からなる免疫センサ用動作電極、
2. 上記多孔質な電極が、有機または無機多孔質体の表面または／および内孔壁に金属薄膜を設けたもの、網状またはスponジ状金属、および網状炭素繊維から選ばれたものである1項記載の免疫センサ用動作電極、及び
3. 多孔質な電極上で、導電性高分子を形成しうる電解重合可能な単量体を支持電解質および抗体または抗原の存在下に水溶液中に電解重合し、形成された導電性高分子中に抗体または抗原を包括固定することを特徴とする免疫センサ用動作電極の製造方法である。

本発明において用いられる多孔質電極は電極としての導電性を有する多孔質体であり、特に有機または無機多孔質体の表面または／および内孔壁

ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアクリロニトリル、ポリ(メタ)アクリル酸エステル、ポリスルファン、ポリエーテルスルファン、ポリアミド、ポリイミドおよびこれらの共重合体ならびに誘導体等が挙げられる。

本発明で用いられるこれらの多孔質体の平均孔径は、 $1nm \sim 1mm$ であることが望ましい。さらに望ましくは $10nm \sim 10mm$ である。平均孔径が $1nm$ 未満であると、電極用の金属薄膜を多孔質体の内孔壁に形成することが不可能になる。また、孔径が $1mm$ より大きいと多孔質電極の単位体積当りの導電性高分子の占める体積分率が大幅に小さくなり、電極としての機能が低下する。上記多孔質体の空隙率は $5\sim 80\%$ 、好ましくは $20\sim 80\%$ が望ましい。本発明で用いられる多孔質体の表面と内孔壁に設けられる金属としては、電解重合で変質や劣化の少ない金属なら特に制限されず、金、白金、パラジウム、ニッケル、銅、銀、炭素等が挙げられる。これらの金属の薄膜は、例えば真空蒸着法、スパッタリング法、化学メッキ法、イオンプレ-

ティング法、メタルスプレー法などで多孔質体の表面と内孔壁に形成される。金属薄膜の膜厚は、多孔質体の内孔をふさがない程度が望ましく、多孔質体の孔径にもよるが $1\text{nm} \sim 10\mu\text{m}$ が適当である。

本発明で用いられる網状またはスponジ状金属としては導電性高分子を形成するための電解重合反応において変質や劣化のない金属なら特に制限されず、金、白金、パラジウム、ニッケル、銅、銀等が挙げられる。

本発明で用いられる単量体は電解重合法によって導電性高分子を形成するものであれば特に制限されず、例えばピロール、アニリン、チオフェン、フランおよびこれらの誘導体が挙げられる。これらの単量体のうちで、得られる導電性高分子の電導度、力学的強度、化学的稳定性和熱的安定性ならびに多孔電極との密着性などから判断して、ピロールおよびアニリンが特に望ましい。また、電解重合時に用いるドーバントとしては、単量体の種類により異なり、ピロール、チオフェンおよびフ

ランの場合は過塩素酸リチウム塩、テトラエチルアンモニウム過塩素酸塩、テトラエチルアンモニウムホウ酸塩、ヘキサフルオロリン酸等が好適に用いられる。また、アニリンの場合は塩酸が好適に用いられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

本発明で導電性高分子に固定される抗体または抗原はいかなるものも可能であり、例えばIgG、IgM等の各種免疫グロブリン、アルブミン、hCG等が挙げられる。

抗体または抗原は、多孔質電極上で電解重合可能な単量体を支持電解質および抗体または抗原ともに水溶液中に電解重合することによって、導電性高分子に包括され、多孔質電極の表面または／および内孔壁に固定される。重合時の溶液中の単量体の濃度は一般に $0.01\text{ mol/l} \sim 0.5\text{ mol/l}$ であり、支持電解質は 0.1 mol/l 程度でよい。抗体または抗原は溶液に溶解する程度であり、例えばヒトのIgGの場合には $0.01\text{ mg/ml} \sim 0.5\text{ mg/ml}$ である。電解重合は定電位法でも定電流法でも可

能であり、定電位法では銀／塩化銀電極に対して $0.2\text{V} \sim 1.5\text{V}$ の電位で、定電流法では $0.1\text{mA/cm}^2 \sim 50\text{mA/cm}^2$ の電流密度で電解重合する。このようにして得られた抗体または抗原を包括固定した導電性高分子の膜厚は多孔質電極の内孔をふさがない程度が望ましく、多孔質電極の孔径にもよるが、 $1\text{nm} \sim 10\mu\text{m}$ が適当である。また、多孔質電極中の抗体または抗原を包括固定した導電性高分子は連続層となっていることが好ましい。

このようにして得た抗体または抗原を固定した多孔質電極を、適当な容器内に入れられたゲル状電解質に漬け、参照電極に対する電位差変化を測定する。参照電極は抗体または抗原を固定していない上記多孔質電極を用いるか、抗体または抗原を失活させた多孔質電極を用いることが望ましい。抗原または抗体を含む溶液を上記ゲル状電解質に滴下した際に生じる電位差変化が検出応答である。

(5) 発明の効果：

かくして本発明の多孔質な電極上に形成された導電性高分子および該高分子中または／および表

面に固定された抗体または抗原からなる免疫センサは単位体積当たりの表面積が非常に大きく、その結果高感度化が達成され、液体中に含まれる稀薄濃度の抗原または抗体の検出を行うことが可能である。また、長時間水溶液中に放置しても固定した抗体あるいは抗原は脱離せず検出特性の劣化は認められない。また、驚くべきことには抗原または抗体を検出した後、多孔質電極を蒸溜水で洗浄し抗原または抗体を含む溶液に漬けると特別な再生処理を行わずに再び抗原または抗体の検出が可能になることも本発明において明らかになった。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

実施例 1

ポリエチレンテレフタレートの不織布（日本バイリーン㈱MF-135K）を常法に従い化学メッキした。すなわち、塩化スズ水溶液に浸漬後、 0.1M の塩化パラジウムの 0.1M 塩酸水溶液に浸漬した後、乾燥

した。ついで、ニッケルアンモニウムサルファイト31.6g, 次亜リン酸ナトリウム42.4g, 酒石酸ナトリウム55.2g, 硫酸アンモニウム40.6g, ホウ酸59.4gを蒸溜水1lに溶解した液を水酸化ナトリウム水溶液でpH9に調整した溶液に浸漬した。上記方法でニッケルをメッキしたフィルタを多孔質電極として用いた。この多孔質電極の電導度は32.1 S/cmで平均孔径12.5μmであった。0.1Mテトラエチルアンモニウムバーコロレートと0.3Mピロールを含むプロピレンカーボネート溶液に上記多孔質電極を浸漬し銀／塩化銀電極に対して1.1Vの定電位条件で電気量が0.8C/cm²に達するまで電解重合を行った。乾燥、洗浄後さらに0.1M塩化カリウムと0.15Mピロールと0.25mg/mlのIgGを含む蒸溜水に浸漬し銀／塩化銀電極に対して0.65Vの定電位条件で電気量が0.1C/cm²に達するまで電解重合を行った。走査型電子顕微鏡によるとIgGを含むポリピロールの薄膜が不織布の表面および内孔壁に連続的に形成しており、また多孔質電極の内孔をふさがっていないことが観察された。

比較例

白金を0.1M塩化カリウムと0.15Mピロールと0.25mg/mlのIgGを含む蒸溜水に浸漬し、銀／塩化銀電極に対して0.65Vの定電位条件で電気量が0.1C/cm²に達するまで電解重合を行った。実施例1と同様に測定したところ 5×10^{-10} mol/mlのペルオキシターゼ標識抗IgGに対して0.5mVの電位差変化しか生じなかった。

特許出願人 帝人株式会社
代理人 弁理士 前田純博



このIgGを固定した多孔質電極を25mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)とウシ血清アルブミンを混合した0.7重量%の寒天に浸漬しIgGを固定していない多孔質電極との電位差測定を行った。その結果、ペルオキシターゼを標識した抗IgGの濃度 5×10^{-10} mol/mlに対して5.2mVの電位差変化が生じた。25mMのリン酸緩衝液(pH 6.8)に7日間浸漬した後、同様な測定を行ったところ 5×10^{-10} mol/mlのペルオキシターゼ標識抗IgGに対して5.1mVの電位差変化が生じ、応答の劣化が見られなかった。

実施例2

白金メッシュ(80メッシュ)を0.1M塩化カリウムと0.15Mピロールと0.25mg/mlのIgGを含む蒸溜水に浸漬し、銀／塩化銀電極に対して0.65Vの定電位条件で電気量が0.1C/cm²に達するまで電解重合を行った。実施例1と同様に測定したところ 5×10^{-10} mol/mlのペルオキシターゼ標識抗IgGに対して4.0mVの電位差変化が生じた。